



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 028 153⁽¹³⁾ C1
(51) МПК⁶ A 61 K 35/80

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4938465/14, 20.05.1991

(46) Дата публикации: 09.02.1995

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 1275810, кл. A 61K 35/78, 1984.

(71) Заявитель:
Пятигорский фармацевтический институт

(72) Изобретатель: Макарова Р.Н.,
Самокиш И.И., Компанцев В.А., Кайшева
Н.Ш., Василенко Ю.К., Мащенко
Н.П., Добровольский Ю.Н., Лобова
Е.И., Ивашев М.Н., Сорокоумова Н.А.

(73) Патентообладатель:
Пятигорский фармацевтический институт

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛАМИНАРИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к химико-фармацевтической промышленности, и касается способа получения биологически активных веществ из ламинарии. Цель изобретения - интенсификации переработки сырья для одновременного получения нескольких биологически активных веществ и повышение выхода водорастворимого полисахаридного комплекса. Сущность: последовательное экстрагирование измельченных слоевищ *Zaminaria saccharina* и

z. digitata с целью получения по единой технологии продукта: маннита, водорастворимого полисахарида комплекса, ламинарана, фукоидана и альгината натрия. Положительный эффект заключается в одновременном получении нескольких продуктов, обладающих сильно выраженным слабительным действием, а также альгината натрия, обладающего радионуклидсвязывающим действием, а также в повышении выхода водорастворимого полисахаридного комплекса до 12,6%. 36 табл.

RU 2 028 153 C1

RU 2 028 153 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 028 153** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 35/80**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4938465/14, 20.05.1991

(46) Date of publication: 09.02.1995

(71) Applicant:
Pjatigorskij farmatsevticheskij institut

(72) Inventor: Makarova R.N.,
Samokish I.I., Kompantsev V.A., Kajsheva
N.Sh., Vasilenko Ju.K., Mashchenko Nikolaj
Petrovich, Dobrovol'skij Jurij Nikolaevich, Lobova
E.I., Ivashev M.N., Sorokoumova N.A.

(73) Proprietor:
Pjatigorskij farmatsevticheskij institut

(54) **METHOD OF PREPARING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE FROM LAMINARIA**

(57) **Abstract:**

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves the sequence extraction of minced thallus of Laminaria saccharina and L. digitata for preparing of mannitol, water-soluble polysaccharide complex, laminarane, fucoidane and sodium alginate by common technology. Method ensures to prepare

some products simultaneously showing strong purgative effect, and sodium alginate showing radionuclide-binding property also, and water-soluble polysaccharide complex with increased yield (up to 12.6%). EFFECT: intensified process, increased yield of polysaccharide complex. 36 tbl

RU 2 028 153 C1

RU 2 028 153 C1

Изобретение относится к методам одновременного получения маннита, водорастворимого полисахаридного комплекса, ламинарана, фукоидана, альгината натрия из беломорских водорослей рода *Laminaria* и может быть использовано в медицине, фармации, микробиологии, в производствах, связанных с радиоактивными металлами.

Известен способ получения полисахаридов из морской капусты *Laminaria saccharina* L.) путем измельчения, промывки слоевищ морской капусты, экстракции горячей водой при 80°C методом настаивания или противоточной перколяции, отделения экстракта от сырья, упаривания экстракта до соотношения 1: 0,8-1: 1,2, прибавления к горячему экстракту 96%-ного этилового спирта в соотношении экстракт: этанол 1: 1. Затем образовавшуюся смесь отстаивают, отделяют нижний слой взвеси, центрифугируют и после отделения маточного раствора осадок промывают 96% этиловым спиртом. Промытый осадок сушат, измельчают. Выход готового продукта составляет 5,6% к загрязненному сырью. Полученный комплекс полисахаридов оказывает слабительное действие и известен как лекарственный препарат "Ламинарид". Данный способ получения близок к заявляемому и выбран за прототип.

Недостатками указанного способа являются: а) получение только одного продукта из водорослей (полисахаридов), при этом отходами производства являются ценные биологически активные вещества - маннит, ламинаран, фукоидан, альгинат натрия; б) низкий выход полисахаридов (5,6% к сырью); в) неполное осаждение полисахаридов этанолом за счет недостаточного количества этанола; г) потеря этанола при добавлении его к горячему концентрированному экстракту для осаждения полисахаридов.

Целью изобретения является комплексная переработка беломорских водорослей с целью одновременного получения маннита, водорастворимого полисахаридного комплекса, ламинарана, фукоидана, альгината натрия, повышение выхода водорастворимого полисахаридного комплекса, расширение сырьевой базы, повышение биологической активности целевого продукта, расширение спектра биологического действия.

Цель достигается тем, что способ одновременного получения маннита, водорастворимого полисахаридного комплекса, ламинарана, фукоидана, альгината натрия, обладающих слабительным, гиполипидемическим, радионуклидсвязывающим, гепатозащитным, противовоспалительным действием, из беломорской ламинарии (естественной смеси двух видов ламинарии - *Laminaria saccharina* L. и *Laminaria digitata* L.) осуществляют путем измельчения сырья, последовательного экстрагирования 90-96%-ным этанолом, горячей водой и 1,5% раствором карбоната натрия; этанольное извлечение концентрируют и кристаллизуют из него маннит; из водного экстракта 96%-ным этанолом осаждают водорастворимый полисахаридный комплекс; при этом оставшийся спиртовой маточный раствор

упаривают и 80% этанолом осаждают ламинаран и фукоидан, для разделения последних полученный осадок обрабатывают 0,4%-ным раствором соляной кислоты и добавляют 0,5 М раствор цетавлона для перевода кислых полисахаридов в осадок, экстракт обрабатывают этанолом (для высаживания ламинарана), а оставшийся осадок вновь растворяют в 0,4% растворе соляной кислоты и обрабатывают 70% этанолом (фукоидан); из карбонатного извлечения после предварительной обработки концентрированной серной кислотой, раствором двууглекислого натрия получают альгинат натрия.

Согласно заявляемому способу сначала проводят сушку сырья при 50 °С, после чего освобождают его от механических примесей. Затем сырье измельчают до размера частиц 3 мм и экстрагируют 90-96%-ным этанолом в соотношении сырье: этанол 1: 6 в аппарате Сокслета при температуре кипения экстрагента в течение 3 ч. Профильтрованный спиртовой экстракт упаривают до гущенного остатка, кристаллизуют, выпавшие кристаллы маннита очищают перекристаллизацией. Далее, после удаления остатков спирта из водорослей, последние экстрагируют двукратно водой в соотношении 1:10 при температуре 80°C в течение 30 мин, водные экстракты объединяют, фильтруют, упаривают под вакуумом при остаточном давлении 0,3 атм и температуре 70°C до плотности 1,05-1,06 г/см³; водорастворимый полисахаридный комплекс осаждают 96% этанолом из охлажденного экстракта в соотношении экстракт:этанол 1:2, комплекс фильтруют, трехкратно очищают 96% этанолом, сушат. Оставшийся после осаждения водорастворимого полисахаридного комплекса спиртовой маточный раствор упаривают до 1/10 первоначального объема, после чего гущенный экстракт обрабатывают 80% этанолом в соотношении экстракт:этанол 1:3. Полученный осадок (ламинаран и фукоидан) центрифугируют. Для разделения ламинарана и фукоидана отцентрифугированный осадок обрабатывают 0,4% раствором соляной кислоты при соотношении осадок:раствор соляной кислоты 1:5 при комнатной температуре в течение 2,0 ч; затем к полученному раствору добавляют 0,5 М раствор цетавлона для перевода кислых полисахаридов в осадок. Осадок отделяют, а надосадочную жидкость обрабатывают 80% этанолом (для высаживания ламинарана) в соотношении надосадочная жидкость:этанол 1:3. Полученный ламинаран фильтруют, очищают 96% этанолом, сушат. Осадок, образованный после добавления цетавлона, растворяют в 0,4% растворе соляной кислоты в соотношении осадок:раствор соляной кислоты 1:10 и обрабатывают 70% этанолом в соотношении раствор: этанол 1:3, выпадает осадок фукоидана, который фильтруют, очищают, сушат. После этого оставшийся жом водорослей экстрагируют 1,5% раствором карбоната натрия в соотношении 1:20 при температуре 50°C в течение 1 ч; водно-щелочной экстракт фильтруют, фильтрат обрабатывают концентрированной серной кислотой, выпавший при этом осадок отделяют, обрабатывают 1,5%-ным раствором карбоната натрия и получают

альгинат натрия осаждением 96% этанолом в соотношении раствор:этанол 1:5. Альгинат натрия фильтруют, сушат.

Преимущества заявляемого способа заключаются в комплексной переработке ламинарии: одновременном получении из беломорской ламинарии пяти продуктов: маннита, водорастворимого полисахаридного комплекса, ламинарана, фукоидана, альгината натрия. Все целевые продукты обладают биологическим действием. Описано слабительное действие только для полисахаридного комплекса из ламинарии. Разработанная нами технологическая схема позволяет получить целевые продукты с выраженным слабительным действием, превосходящим действие официального препарата "Ламинарид": маннит проявляет слабительное действие, превосходящее "Ламинарид" на 41,1%, водорастворимый полисахаридный комплекс - на 5,2-60,0% (в зависимости от используемых методик испытаний и видов животных), ламинаран и фукоидан - на 20,5%, альгинат натрия - на 141,1%. Кроме того, водорастворимый полисахаридный комплекс обладает выраженным радионуклидсвязывающим, гиполипидемическим, гепатозащитным и противоязвенным действием, превосходящим или повторяющим аналогичное действие официальных препаратов. Альгинат натрия также проявляет выраженное радионуклидсвязывающее и гипохолестеринемическое действие. Все виды биологического действия для всех целевых продуктов, кроме слабительного действия полисахаридного комплекса, нами установлены впервые. Сочетание слабительного и радиопротекторного действия для альгината натрия и водорастворимого полисахаридного комплекса способствует быстрому выведению этими продуктами радионуклидов из организма.

Кроме того, заявляемый способ обеспечивает получение целевых продуктов с высоким выходом (в пересчете на сухое исходное сырье): маннит - 7,85%; водорастворимый полисахаридный комплекс - 12,60%; ламинаран - 4,53%; фукоидан - 2,14%; альгинат натрия - 12,41%. Предлагаемый способ может быть использован в условиях промышленной переработки ламинарии. В данном способе используется естественная смесь двух видов сырья, произрастающих в морском бассейне Белого моря: *Laminaria saccharina* L. и *Laminaria digitata* L.

Полученные целевые продукты были подвергнуты качественному и количественному анализу (табл. 1,2,3,4,5,6,7,8,9).

I. Маннит.

Идентификацию полученного маннита проводили методом бумажной хроматографии.

Количественное содержание маннита определяли методом обратной йодометрии в присутствии индикатора крахмала. Титрование проводили до появления зеленой окраски раствора. Содержание маннита составило 99,56%.

Таким образом, коэффициент распределения (R_f), температура плавления, удельное вращение, зольность полученного

маннита, соответствующие аналогичным показателям стандартного маннита, а также высокое количественное содержание маннита свидетельствуют о высокой чистоте полученного продукта.

II. Водорастворимый полисахаридный комплекс.

Идентификацию полисахаридов проводили с помощью цветных реакций, хроматографически.

Результаты анализа водорастворимого полисахаридного комплекса, приведенные в табл.3,4, аналогичны для препарата "Ламинарид", что свидетельствует о соответствии полученного полисахаридного комплекса препарату "Ламинарид".

Количественное содержание полисахаридов определяли по сумме восстанавливающих сахаров по реакции с пикриновой кислотой, спектрофотометрически. Содержание восстанавливающих сахаров составило 76,55% в водорастворимом полисахаридном комплексе. В препарате "Ламинарид" содержание восстанавливающих сахаров достигало 25,64%, т.е. содержание суммы редуцирующих сахаров в образце, полученном по заявляемому способу, в 3 раза превышает этот показатель по сравнению со способом, принятым за прототип.

Таким образом, в результате анализа водорастворимого полисахаридного комплекса идентифицированы полисахариды, установлено высокое содержание редуцирующих сахаров и показано соответствие полученного водорастворимого полисахаридного комплекса официальному препарату "Ламинарид".

III. Ламинаран.

Полученные показатели (таблица 5) согласуются с известными литературными данными.

Моносахаридный состав полученного ламинарана определяли с помощью гидролиза 2 н. серной кислотой при 100°C в течение 6 ч с последующей нейтрализацией гидролизата карбонатом бария методом бумажной хроматографии. Результаты представлены в табл.6.

Полученный ламинаран подвергали ферментативному расщеплению с помощью 1,3- β -глюканазы. При этом ламинаран расщеплялся до глюкозы. Последнюю определяли колориметрическим методом. Содержание ламинарана в полученном образце составило 81,22%.

Итак, результаты анализа подтверждают идентичность и высокое содержание ламинарана.

IV. Фукоидан.

Полученный фукоидан гидролизovali 2 н серной кислотой при 100°C в течение 6 ч с последующей нейтрализацией гидролизата карбонатом бария. Гидролизат анализировали методом бумажной хроматографии. Результаты представлены в табл.7.

Количественное определение фукоидана проводили спектрофотометрическим методом по реакции взаимодействия фукоидана с тиогликолевой кислотой в среде серной кислоты. Содержание фукоидана составило 72,25%.

Полученные результаты подтверждают идентичность фукоидана.

V. Альгинат натрия.

Количественное определение альгината натрия проводили методом обратного титрования раствором гидроксида натрия избытка серной кислоты, оставшейся после взаимодействия ее с альгинатом натрия. Содержание альгината натрия составило 91,15%.

Таким образом, полученные результаты анализа подтверждают подлинность и высокое количественное содержание альгината натрия.

Нами изучена зависимость выхода целевых продуктов от ряда технологических параметров (табл. 10-31).

Как видно из таблицы 10, наибольший выход маннита обеспечивается при концентрации этанола 90-96%.

Как следует из табл.11, максимальный выход маннита обеспечивается при использовании соотношения сырье:экстрагент 1:6.

Из таблицы 12 видно, что наибольший выход маннита достигается при продолжительности экстракции 3 ч.

Как следует из табл.13 наибольший выход водорастворимого полисахаридного комплекса обеспечивается при температуре экстрагента 80°C.

Результаты, представленные в табл.14 свидетельствуют об оптимальном соотношении сырье:экстрагент 1:10, так как при этом обеспечивается наибольший выход полисахаридного комплекса.

Как следует из табл.15, оптимальной продолжительностью экстракции является 30 мин, так как при этом достигается максимальный выход водорастворимого полисахаридного комплекса.

Из табл.16 следует, что оптимальное соотношение экстракт:этанол при осаждении водорастворимого полисахаридного комплекса достигается в случае 1: 2. Это объясняется наибольшим выходом полисахаридного комплекса.

Как видно из табл.17 наибольший выход ламинарана и фукоидана обеспечивается при использовании 80%-ного этанола.

Из табл.18 видно, что наибольший выход суммы ламинарана и фукоидана достигается при использовании экстрагента в соотношении экстракт:этанол 1:3.

Наибольшая растворимость суммы ламинарана и фукоидана (1,21 г в 100 мл кислоты) обеспечивается при концентрации соляной кислоты 0,4%.

Из табл.20 следует, что наилучшая растворимость осадка достигается при обработке его 0,4% раствором соляной кислоты в соотношении осадок:раствор кислоты 1:5.

Из табл.21 следует, что наиболее полное растворение осадка ламинарана и фукоидана достигается при продолжительности обработки кислотой 2 ч.

Из табл. 22 следует, что максимальный выход ламинарана достигается при концентрации осадителя 80%.

Из табл.23 следует, что наиболее полное осаждение ламинарана обеспечивается при соотношении экстракт:этанол 1:3.

Как видно из табл. 24, наибольший выход фукоидана обеспечивается при использовании этанола в концентрации 70%.

Из табл. 25 следует, что максимальный

выход фукоидана достигается при обработке солянокислого раствора этанолом в соотношении 1:3.

Из табл.26 следует, что максимальный выход альгината натрия обеспечивается при использовании экстрагента - карбоната натрия - в концентрации 1,5% .

Из табл.27 видно, что наибольший выход альгината натрия достигается при соотношении сырье:экстрагент 1:20.

Из табл. 28 следует, что оптимальной температурой экстракции альгината натрия является 50 °С, так как эта температура обеспечивает наибольший выход альгината натрия.

Из табл.29 следует, что оптимальной продолжительностью экстракции сырья является 1,0 ч, при которой выход альгината натрия максимальный (12,41%).

Из табл.30 видно, что наиболее полное осаждение альгината натрия происходит при использовании этанола в концентрации 96%.

Из табл.31 видно, что наиболее полное осаждение альгината натрия происходит при обработке щелочного раствора этанолом в соотношении 1:5.

Заявляемый способ одновременного получения маннита, водорастворимого полисахаридного комплекса, ламинарана, фукоидана, альгината натрия поясняется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Беломорские водоросли (*L. saccharina* L. и *L. digitata* L.) высушивают при 50°C в сушильном шкафу, затем освобождают их от механических примесей, моллюсков. Далее отвешивают 100 г водорослей с точностью $\pm 0,0002$ г, измельчают на лабораторном измельчителе до размера частиц 3 мм и экстрагируют 600 мл 90%-ного этилового спирта в аппарате Сокслета при температуре кипения этанола в течение 3 ч. Полученный спиртовой экстракт фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом, упаривают до образования густого экстракта (примерно 30 мл), добавляют около 10 мл воды, образующуюся пигментную пленку отделяют, далее раствор кристаллизуют при температуре +4°C в холодильнике. Выпавшие кристаллы маннита двукратно очищают перекристаллизацией из спирто-водного раствора. Чистые кристаллы маннита фильтруют через бумажный фильтр и сушат при температуре 60°C в вакуум-сушильном шкафу. Выход маннита составляет 7,85 г или 7,85% к сырию.

Целевой продукт - маннит - представляет собою кристаллы белого цвета, без запаха, хорошо растворим в воде и кипящем спирте, мало растворим в холодном спирте, нерастворим в эфире.

Далее, водоросли, оставшиеся после извлечения маннита, "сушат" под тягой для удаления остатков спирта, после чего их загружают в колбу вместимостью 2 л и заливают 1000 мл горячей (температуре 80 °С) дистиллированной воды. Нагревание смеси проводят на электроплитке при температуре 80°C (контроль температуры осуществляли по термометру). Экстракцию проводят в течение 30 мин двукратно.

Полученные горячие водные экстракты сливают с жома, объединяют, фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через двойную

капроновую ткань. Объединенный профильтрованный экстракт упаривают в колбе Вюрца под вакуумом при остаточном давлении 0,3 атм и температуре 70°C до плотности 1,05-1,06 г/см³ (примерно 1/7 от первоначального объема). Полученный водный концентрат обрабатывают двухкратным объемом 96%-ного этанола. Выпавший осадок водорастворимого полисахаридного комплекса декантируют и фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом через двойную капроновую ткань. Осадок трехкратно промывают на воронке 96%-ным этанолом, сушат при температуре 60°C в вакуум-сушильном шкафу.

Выход водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" составляет 12,60 г или 12,60% к сырью.

Целевой продукт - водорастворимый полисахаридный комплекс типа "Ламинарид" представляет собой аморфный порошок серовато-желтого цвета без запаха. Практически не растворим в спирте. В воде растворяется умеренно с образованием мутного слизистого раствора.

Оставшийся после осаждения водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" спиртовой маточный раствор (примерно 300 мл) упаривают под вакуумом до 1/10 объема. Затем полученный концентрат обрабатывают 90 мл 80%-ного этанола. Выпавший осадок центрифугируют на лабораторной центрифуге при 2000 обор./мин. К отфугованному осадку в стакане добавляют 40 мл 0,4% раствора соляной кислоты, стакан со смесью закрывают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре. После 2 ч к образовавшемуся раствору добавляют 0,5 М раствор цетавлона. При этом кислые полисахариды переходят в осадок. Добавление 0,5 М раствора цетавлона проводят до тех пор, пока не прекратится образование осадка кислых полисахаридов, т.е. в надосадочной жидкости прибавление цетавлона не приводит к образованию осадка. Через 10 мин после отстаивания осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр. Надосадочную жидкость (35 мл) обрабатывают 105 мл 80%-ного этанола. Выпадает осадок ламинарана, его фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера, промывают дважды 96%-ным этанолом, сушат в вакуум-сушильном шкафу при 60°C. Выход ламинарана составляет 4,53 г или 4,53% к сырью.

Целевой продукт - ламинаран - представляет собою порошок светло-бежевого цвета, без запаха, растворим в воде, в кислотах, нерастворим в этаноле.

Далее, осадок кислых полисахаридов, образованный после добавления цетавлона, растворяют в 20 мл 0,4% раствора соляной кислоты путем перемешивания смеси на магнитной мешалке в течение 15 мин. Полученный раствор фукоидана обрабатывают 60 мл 70% этанола. При этом выпадает осадок фукоидан, осадок фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера, промывают дважды 70%-ным этанолом, сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60°C. Выход фукоидана составляет 2,14 г или 2,14% к сырью.

Целевой продукт - фукоидан -

представляет собою порошок светло-розового цвета, без запаха, растворим в воде, в кислотах, нерастворим в этаноле.

Жом водорослей, оставшийся после экстракции описанных выше четырех продуктов, помещают в колбу вместимостью 3 л, заливают 2 л 1,5% раствора карбоната натрия и экстрагируют на водяной бане при температуре 50°C в течение 1 ч. Водно-щелочной экстракт далее декантируют с жома и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера. Затем водно-щелочной экстракт обрабатывают примерно 100 мл концентрированной серной кислоты (99,95%) путем медленного добавления небольших порций кислоты (примерно по 5 мл) к экстракту. При этом выделяется осадок альгиновой кислоты, который отделяют фильтрованием на воронке Бюхнера. Этот осадок переносят количественно в колбу вместимостью 3 л, добавляют 300 мл 1,5%-ного раствора карбоната натрия, перемешивают, осадок альгиновой кислоты переходит в раствор альгината натрия. Альгинат натрия высаждают из раствора путем добавления к нему 1,5 л 96% этанола. Образующийся осадок фильтруют на воронке Бюхнера, сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60°C. Выход альгината натрия составляет 12,41 г или 12,41% к сырью.

Целевой продукт - альгинат натрия - представляет собою тонкие пластинки светло-оранжевого цвета, без запаха, слизистого вкуса, растворимый в воде, нерастворимый в спирте.

Маточные спиртовые растворы подвергаются обработке с целью регенерации из них спирта.

Пример 2. Беломорские водоросли сушат при 50°C, освобождают от механических примесей, отвешивают 100 г для анализа. Навеску водорослей измельчают до частиц 3 мм и экстрагируют 700 мл 96%-ного этанола в аппарате Сокслета при температуре кипения этанола в течение 4 часов. Полученный спиртовой экстракт фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом, упаривают до образования густого остатка (примерно 30 мл), добавляют около 10 мл воды и кристаллизуют при + 4°C в холодильнике. Выпавшие кристаллы маннита двукратно очищают перекристаллизацией. Кристаллы маннита фильтруют и сушат при 60°C. Выход маннита составляет 7,80 г или 7,80% к сырью.

Далее водоросли, оставшиеся после извлечения маннита, "сушат" под тягой для удаления остатков спирта, после чего их загружают в колбу вместимостью 2 л и заливают 1500 мл горячей (температура 90 °C) дистиллированной воды. Нагревание смеси проводят на электроплитке при температуре 90°C. Экстракцию проводят в течение 45 мин двукратно. Полученные горячие водные экстракты сливают с жома, объединяют, фильтруют под вакуумом. Объединенный профильтрованный экстракт упаривают в колбе Вюрца под вакуумом при остаточном давлении 0,3 атм и температуре 70°C до плотности 1,05-1,06 г/см³. Полученный водный концентрат обрабатывают трехкратным объемом 96%-ного этанола. Выпавший осадок

водорастворимого полисахаридного комплекса декантируют и фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом. Осадок трехкратно промывают на воронке 96% -ным этанолом, сушат при температуре 60°C в вакуум-сушильном шкафу.

Выход водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" составляет 12,48 г или 12,48% к сырью.

Оставшийся после осаждения водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" спиртовой маточный раствор (примерно 400 мл) упаривают под вакуумом до 1/10 объема. Затем полученный концентрат обрабатывают 160 мл 90%-ного этанола. Выпавший осадок центрифугируют на лабораторной центрифуге при 2000 обор./мин. К отфугованному осадку в стакане добавляют 45 мл 0,5% раствора соляной кислоты, стакан со смесью закрывают и оставляют на 2,5 ч при комнатной температуре. После 2,5 часов к образовавшемуся раствору добавляют 0,5 М раствор цетавлона для перевода кислых полисахаридов в осадок. Добавление 0,5 М раствора цетавлона проводят до тех пор, пока не прекратится образование осадка кислых полисахаридов. Через 10 мин после отстаивания осадок отделяют через фильтр. Недосадочную жидкость (45 мл) обрабатывают 180 мл 90%-ного этанола. Выпавший осадок ламинарана фильтруют под вакуумом, промывают дважды 96%-ным этанолом, сушат в вакуум-сушильном шкафу при 60°C. Выход ламинарана 4,50 г или 4,50% к сырью.

Далее, осадок кислых полисахаридов, образованный после добавления цетавлона, растворяют в 20 мл 0,5% раствора соляной кислоты путем перемешивания смеси на магнитной мешалке в течение 15 мин. Полученный раствор фукоидана обрабатывают 80 мл 80% этанола. При этом выпадает осадок фукоидана, который фильтруют под вакуумом, промывают дважды 80%-ным этанолом, сушат при 60°C. Выход фукоидана составляет 2,10 г или 2,10% к сырью.

Жом водорослей, оставшийся после экстракции описанных выше 4-х продуктов, помещают в колбу вместимостью 3 л, заливают 2,5 л 2,0% раствора карбоната натрия и экстрагируют на водяной бане при температуре 60°C в течение 1,5 ч. Водно-щелочной экстракт далее декантируют с жома и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера. Затем водно-щелочной экстракт обрабатывают примерно 150 мл концентрированной серной кислоты (99,95%) путем медленного добавления небольших порций кислоты (5 мл) к экстракту. При этом выделяющийся осадок альгиновой кислоты фильтруют, переносят количественно в колбу вместимостью 3 л, добавляют 300 мл 1,5%-ного раствора карбоната натрия, перемешивают, осадок альгиновой кислоты переходит в раствор альгината натрия. Альгинат натрия высаждают из раствора путем добавления к нему 1,8 л 96%-ного этанола. Образующийся осадок фильтруют и сушат при температуре 60°C. Выход альгината натрия составляет 12,35 г или 12,35% к сырью.

П р и м е р 3. Беломорские водоросли

сушат при 50°C, освобождают от механических примесей, отвешивают 100 г для анализа. Навеску водорослей измельчают до частиц 3 мм и экстрагируют 500 мл 85%-ного этанола в аппарате Сокслета при температуре кипения этанола в течение 2 ч. Полученный спиртовой экстракт фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом, упаривают до образования сгущенного остатка (примерно 30 мл), добавляют около 10 мл воды и кристаллизуют при 4°C в холодильнике. Выпавшие кристаллы маннита двукратно очищают перекристаллизацией. Кристаллы маннита фильтруют и сушат при 60°C. Выход маннита составляет 7,13 г или 7,13% к сырью.

Далее, водоросли, оставшиеся после извлечения маннита, "сушат" под тягой для удаления остатков спирта, после чего их загружают в колбу вместимостью 2 л и заливают 500 мл горячей (температура 70°C) дистиллированной воды. Нагревание смеси проводят на электроплитке при температуре 70°C. Экстракцию проводят в течение 15 мин двукратно. Полученные горячие водные экстракты сливают с жома, объединяют, фильтруют под вакуумом. Объединенный профильтрованный экстракт упаривают в колбе Вюрца под вакуумом при остаточном давлении 0,3 атм и температуре 70°C до плотности 1,05-1,06 г/см³. Полученный водный концентрат обрабатывают однократным объемом 96%-ного этанола. Выпавший осадок водорастворимого полисахаридного комплекса декантируют и фильтруют на воронке Бюхнера под вакуумом. Осадок трехкратно промывают на воронке 96% -ным этанолом, сушат при температуре 60°C в вакуум-сушильном шкафу. Выход водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" составляет 11,38 г или 11,38% к сырью.

Оставшийся после осаждения водорастворимого полисахаридного комплекса типа "Ламинарид" спиртовой маточный раствор (примерно 200 мл) упаривают под вакуумом до 1/10 объема. Затем полученный концентрат обрабатывают 40 мл 70% -ного этанола. Выпавший осадок центрифугируют на лабораторной центрифуге при 2000 обор./мин. К отфугованному осадку в стакане добавляют 30 мл 0,3% раствора соляной кислоты, стакан со смесью закрывают и оставляют на 1,5 часа при комнатной температуре. После 1,5 ч к образовавшемуся раствору добавляют 0,5 М раствор цетавлона для перевода кислых полисахаридов в осадок. Добавление 0,5 М раствора цетавлона проводят до тех пор, пока не прекратится образование осадка кислых полисахаридов. Через 10 мин после отстаивания осадок отделяют через фильтр. Недосадочную жидкость (25 мл) обрабатывают 50 мл 70%-ного этанола. Выпавший осадок ламинарана фильтруют под вакуумом, промывают дважды 96%-ным этанолом, сушат в вакуум-сушильном шкафу при 60°C. Выход ламинарана 4,11 г или 4,11% к сырью.

Далее, осадок кислых полисахаридов, образованный после добавления цетавлона, растворяют в 20 мл 0,3% раствора соляной кислоты путем перемешивания смеси на магнитной мешалке в течение 15 мин.

Полученный раствор фукоидана обрабатывают 40 мл 60% этанола. При этом выпадает осадок фукоидана, который фильтруют под вакуумом, промывают дважды 60%-ным этанолом, сушат при 60°C. Выход фукоидана составляет 1,95 г или 1,95% к сырью.

Жом водорослей, оставшийся после экстракции описанных выше 4-х продуктов, помещают в колбу вместимостью 2 л, заливают 1,5 л 1,0% раствора карбоната натрия и экстрагируют на водяной бане при температуре 40°C в течение 0,5 ч. Водно-щелочной экстракт далее декантируют с жома и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера. Затем водно-щелочной экстракт обрабатывают примерно 50 мл концентрированной серной кислоты (99,95%) путем медленного добавления небольших порций кислоты (5 мл) к экстракту. При этом выделяющийся осадок альгиновой кислоты фильтруют, переносят количественно в колбу вместимостью 2 л, добавляют 300 мл 1,5%-ного раствора карбоната натрия, перемешивают, осадок альгиновой кислоты переходит в раствор альгината натрия. Альгинат натрия высаждают из раствора путем добавления к нему 1,2 л 90%-ного этанола. Образующийся осадок фильтруют и сушат при температуре 60°C. Выход альгината натрия составляет 12,01 г или 12,01% к сырью.

Целевые продукты были проверены на биологические активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАННИТА

а) ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

В опытах на 36 белых крысах массой 200-230 г методом Кербера при пероральном введении установлено для маннита $LD_{50} > 5000$ мг/кг. Согласно классификации токсичности веществ маннит следует отнести к группе практически нетоксичных веществ.

б) СЛАБИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Изучено слабительное действие маннита описанным в литературе способом, для чего регистрировалась масса кала за 24 часовой отрезок времени, после перорального введения маннита в дозе 200 мг/кг в виде водного раствора в объеме 5 мл. Опыты ставились на 36 белых крысах массой 200-220 г. В качестве препарата сравнения использовалось официальное слабительное средство "Ламинарид" в той же дозе. Установлено, что суточная масса кала после введения маннита составила $2,4 \pm 0,18$ г против $0,7 \pm 0,04$ г в контрольных опытах с введением физиологического раствора ($P < 0,05$) и $1,7 \pm 0,18$ г в опытах с введением ламинарида ($P < 0,05$).

Таким образом, слабительное действие маннита превосходило уровень контрольных опытов на 24,28%, а официального слабительного препарата ламинарида - на 41,1%, что позволяет рекомендовать исследованный маннит как эффективное слабительное средство.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАМИНАРАНА И ФУКОИДАНА

а) ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

В опытах на 36 белых крысах массой 190-230 г методом Кербера при пероральном введении установлено для ламинарана и фукоидана $LD_{50} > 5000$ мг/кг, что позволяет отнести данное вещество к группе практически нетоксичных веществ.

б) СЛАБИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Изучение слабительного действия ламинарана и фукоидана путем регистрации суточной массы кала после перорального его введения в дозе 200 мг/кг в объеме 3 мл водного раствора в опытах на 36 белых крысах показало, что масса кала в опытах с ламинараном и фукоиданом составила $2,05 \pm 0,32$ г против $0,63 \pm 0,11$ г в контрольных опытах с введением физиологического раствора ($P < 0,05$) и $1,7 \pm 0,18$ г в опытах с введением официального слабительного средства ламинарида ($P > 0,05$).

Таким образом, слабительное действие ламинарана и фукоидана превосходило уровень контрольных опытов на 225,3%, а ламинарида - официального слабительного препарата - на 20,5%, что позволяет рекомендовать исследуемые вещества в качестве эффективных слабительных средств.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

а) ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

В опытах на 36 белых крысах массой 210-230 г методом Кербера при пероральном введении установлено для альгината натрия $LD_{50} > 5010$ мг/кг, что позволяет отнести альгинат натрия к группе практически нетоксичных веществ.

б) СЛАБИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Изучение слабительного действия путем определения суточной массы кала после перорального введения альгината натрия в дозе 200 мг/кг в опытах на 36 белых крысах показало, что масса кала в опытах с альгинатом натрия составила $4,1 \pm 0,3$ г против $0,7 \pm 0,09$ г в контрольных опытах с введением физиологического раствора ($P < 0,05$) и $1,7 \pm 0,18$ г в опытах с введением официального слабительного препарата ламинарида ($P < 0,05$). Таким образом, слабительное действие альгината натрия превышало аналогичный эффект контрольных опытов на 485,7%, официального препарата ламинарида - на 141,1%.

в) ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Гипохолестеринемическое действие альгината натрия изучалось на 30 белых крысах с гиперхолестеринемией, вызванной однократным внутрибрюшинным введением тритона в дозе 50 мг/кг. Установлено, что пероральное введение животным с гиперхолестеринемией альгината натрия в дозе 200 мг/кг обусловило снижение в сыворотке крови общего холестерина до $1,96 \pm 0,13$ ммоль/л против $3,64 \pm 0,26$ ммоль/л у животных с гиперхолестеринемией (контроль), т.е. на 46,3% ($P < 0,001$). У интактных животных уровень общего холестерина в сыворотке крови составил $1,29 \pm 0,26$ ммоль/л. Таким образом, альгинат натрия вызывает значительное снижение общего холестерина в крови, по-существу

обеспечивая нормализацию его содержания у животных с гиперхолестеринемией (разница в уровне холестерина у здоровых животных и животных, получавших альгинат натрия, была мало существенной $P>0,05$).

г) РАДИОНУКЛИДСВЯЗЫВАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ

Изучение радионуклидсвязывающей активности (РНСА) альгината натрия проводилось по разработанной в Киевском государственном институте усовершенствования врачей методике, которая защищена авт.св. N 274598. В качестве индикатора использовали стронций-85. Эталонном сравнения служил цитрусовый пектин. Результаты испытаний представлены в табл.32.

Полученные результаты позволяют заключить, что альгинат натрия обладает радионуклидсвязывающей активностью, превышающей такую активность эталона - цитрусового пектина - на 45,36%.

Результаты изучения слабительного, гипохолестеринемического, радионуклидсвязывающего действия альгината натрия, а также его низкая токсичность позволяет оценить его как перспективное лечебное средство.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА

а) ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

В опытах на 36 белых крысах массой 180-240 г методом Кербера при пероральном введении установлено для водорастворимого полисахаридного комплекса $LD_{50}>3500$ мг/кг. В опытах на 36 белых мышах массой 20-40 г методом Кербера при внутрибрюшинном введении для данного комплекса установлено $LD_{50}>1000$ мг/кг. Согласно классификации токсических веществ исследованное вещество следует отнести к группе малотоксичных веществ.

б) СЛАБИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Слабительное действие изучаемого вещества изучалось на белых крысах и собаках описанными методами. В одном случае (опыты на 18 крысах) о слабительной активности веществ судили по величине пассажа (в мм) по кишечнику с использованием метки. Метка делалась путем введения крысам зондом в желудок 5% взвеси активированного угля. За 20 мин до перорального введения исследуемых веществ в дозе 200 мг/кг в объеме 2 мл водного раствора. Животных забивали через 2 ч декапированием и измеряли степень продвижения активированного угля (метки). В других опытах (опыты на 18 крысах и 12 собаках) о слабительном действии исследуемых веществ судили по величине дефекации животных (количестве и консистенции кала), помещенных в специальные для этих целей клетки. В этом случае животным перорально вводились исследуемое вещество в дозе 200 мг/кг в объеме 2 мл крысам или 300 мл собакам водного раствора с последующим (через 24 ч) взвешиванием фекалий (в г) и описанием их консистенции. В контрольных опытах в соответствующих количествах вводился физиологический раствор. Установлено, что при введении водорастворимого комплекса крысам пассаж по кишечнику достигал

42,5 \pm 1,3 мм против 6,8 \pm 0,9 мм в контрольных опытах ($P>0,05$) и 33,2 \pm 1,6 мм в опытах с официальным слабительным препаратом ламинарид, вводимым в тех же количествах, что и исследуемое вещество ($P<0,05$).

Дефекация у крыс, получавших водорастворимый комплекс достигала за сутки 10,0 \pm 0,7 г против 3,8 \pm 0,5 г в контрольных опытах ($P<0,05$) и 9,5 \pm 0,7 г в опытах с официальным слабительным препаратом ламинарид ($P>0,05$), а дефекация у собак соответственно - 182,5 \pm 8,4 г против 85,0 \pm 3,4 г ($P<0,001$) и 114,0 \pm 3,9 г ($P<0,001$). Таким образом, под влиянием водорастворимого полисахаридного комплекса слабительный эффект усиливался в зависимости от методики опыта и вида животных на 114,7 - 523,5% по сравнению с контрольными опытами, превосходя на 5,2-60,0% действие официального слабительного препарата ламинарида.

По своему химическому составу водорастворимый полисахаридный комплекс, полученный из беломорских водорослей, наиболее близок к официальному слабительному средству ламинариду, получаемому из дальневосточных водорослей.

Разностороннее изучение фармакологической активности водорастворимого полисахаридного комплекса выявило, наряду со слабительным действием ряд дополнительных свойств: гепатозащитное, гиполипидемическое, противоязвенное.

в) ГЕПАТОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Гепатозащитное действие водорастворимого комплекса изучалось в опытах на белых крысах с дистрофическим поражением печени, вызванным трехразовым пероральным введением через день четыреххлористого углерода по 0,3 мл на 100 г массы тела в 50% масляном растворе. Исследуемый комплекс в дозе 200 мг/кг вводился перорально в 2 мл водного раствора в течение 12 дней, из которых в последние 6 дней одновременно вводился четыреххлористый углерод. В качестве веществ сравнения использовались официальный препарат ламинарид (в дозе 200 мг/кг) - прототип по строению и способу получения и официальный гепатозащитный препарат силибор (в терапевтической дозе - 10 мг/кг) - прототип по действию.

В сыворотке крови определялись активность аланинаминотрансферазы (АлТ) с помощью набора реактивов Bachringer Mannheim (ФРГ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) с помощью набора реактивов "Лахема" (ЧССР), и общего билирубина по Йендрашку в модификации Л.Т. Лукьянова. Кроме того, в ткани печени определяли содержание триглицеридов по Готтфрицу и Розенбергу в модификации Н. А. Сентебовой и Н.Б. Самецкой.

Как видно из табл.33, гепатозащитное действие исследованного комплекса превосходило влияние ламинарида и мало отличалось по эффективности от официального гепатозащитного протектора силибора, обуславливая нормализацию нарушенных в условиях экспериментальной дистрофии печени показателей

аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, триглицеридов и общего билирубина в крови и триглицеридов в тканях печени. Эти результаты свидетельствуют, что выделенный из беломорских водорослей водорастворимый полисахаридный комплекс обладает отчетливыми гепатозащитными свойствами, приближающимися по своей выраженности к действию официального препарата силибора.

г) ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Гиполипидемическое действие водорастворимого полисахаридного комплекса исследовалось в опытах на белых крысах с моделью гиперлипидемии, вызванной ежедневным, в течение 4-х дней, пероральным введением 2 мл смеси спиртового и масляного растворов витамина D₂ из расчета 80000 ЕД на 100 г массы тела и холестерина по 200 мг/кг.

Параллельно животным в желудок с помощью зонда вводился исследуемый комплекс из расчета 200 мг/кг в 2 мл водного раствора. В качестве веществ сравнения использовались официальный препарат ламинарид (в дозе 200 мг/кг) - прототип по строению и способу получения и официальный противоатеросклеротический препарат полиспонин (в терапевтической дозе - 10 мг/кг) - прототип по действию. В сыворотке крови декапитированных крыс определяли общий холестерин по Ильку и триглицериды с помощью набора реактивов фирмы "Лахема" (ЧССР). В тканях аорты животных определяли содержание холестерина по Т.Н. Ловягиной и Э.Б. Баньковской.

Результаты опытов, представленные в табл.34, свидетельствуют о том, что водорастворимый полисахаридный комплекс наиболее заметно понижает уровень триглицеридов в крови, слабее - снижает в крови уровень холестерина и не оказывает существенного влияния на содержание холестерина в тканях аорты. Подобное же влияние, но более слабое в отношении триглицеридов присуще ламинариду. Гипохолестеринемическая активность водорастворимого полисахаридного комплекса была несколько выше официального противоатеросклеротического препарата полиспонина. В отличие от последнего гипохолестеринемическое действие комплекса сочеталось со значительным гипотриглицеридемическим влиянием. Это позволяет считать, что исследованный комплекс из беломорских водорослей по своей гиполипидемической эффективности превосходит действие официального препарата полиспонина.

г) ПРОТИВОЯЗВЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ

Исследование противоязвенного действия водорастворимого полисахаридного комплекса в сопоставлении с действием препарата "Ламинарид" проводилось на 30 белых крысах массой 185-210 г, у которых язвы желудка вызывались путем сочетания голодания и введения гистамина согласно рекомендациям руководства. Для этого в первые сутки животные полностью голодали, получая лишь воду. На вторые и третьи сутки полное голодание, сочетающееся с подкожным введением утром и вечером гистамина по 0,4 мл 0,1% раствора (из расчета 0,2 мг на 100 г массы). Все эти

животные были разбиты на три группы по 10 крыс в каждой. Одна группа крыс в течение вышеуказанных трех суток получала перорально один раз в сутки по 0,5 г водорастворимого полисахаридного комплекса с 5 мл воды. Вторая группа крыс в аналогичных условиях по 0,5 г препарата ламинарид с 5 мл воды. Третья группа крыс была контрольной. На четвертые сутки все животные забивались декапитацией. После вскрытия проводилось микроскопическое исследование слизистой желудка с помощью лупы. У животных обнаруживались главным образом на малой кривизне желудка и в привратнике геморрагические эрозии и язвы, количество которых было различным у разных групп животных. Характерно, что у крыс, получавших водорастворимый комплекс и препарат ламинарид, в полости желудка обнаруживалось большое количество слизи. Результаты опытов представлены в таблице 35.

Как видно из представленных данных, количество язв и эрозий было существенно ниже у животных, получавших исследуемое вещество, по сравнению с контрольными животными. Причем эффективность действия водорастворимого комплекса из водорослей и препарата ламинарид оказалось одинаковым.

Таким образом, следует сделать вывод о наличии у водорастворимого комплекса из беломорских водорослей, равно как и у препарата ламинарид, выраженной противоязвенной активности, что, по видимому, связано с их обволакивающими и адсорбирующими свойствами.

е) РАДИОНУКЛИДСВЯЗЫВАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ

Изучение радионуклидсвязывающей активности (РНСА) водорастворимого комплекса (ВК) типа "Ламинарид" из беломорских водорослей проводилось по разработанной в Киевском государственном институте усовершенствования врачей методике, которая защищена авт.св. N 274598. В качестве индикатора использовали стронций-85. Эталонном сравнения служил цитрусовый пектин. Результаты испытаний представлены в табл.36.

Полученные результаты позволяют заключить, что образец ВК типа "Ламинарид", выделенный из беломорских водорослей, обладает высокой радионуклидсвязывающей активностью, превосходящей такую активность эталона - цитрусового пектина - на 280,78%.

Анализ результатов исследований фармакологической активности водорастворимого полисахаридного комплекса из беломорских водорослей позволяет прийти к заключению о полифункциональности в действии данного объекта и его высокой эффективности: ему свойственно слабительное, радионуклидсвязывающее, гепатозащитное, гиполипидемическое и противоязвенное влияние, обычно превосходящее по своей силе соответствующие прототипы по строению (ламинарид) и по действию (силибор, полиспонин, цитрусовый пектин).

Таким образом, заявляемый способ обеспечивает следующий положительный эффект:

1. Обеспечивается комплексная переработка смеси ламинарий Белого моря,

при которой получают одновременно 5 продуктов: маннит, водорастворимый полисахаридный комплекс, ламинаран, фукоидан, альгинат натрия. В то время как известный способ позволяет получить только полисахаридный комплекс "Ламинарид", а другие биологически активные вещества остаются в отходах производства;

2. Повышение выхода водорастворимого полисахаридного комплекса: в заявляемом способе выход - 12,60%, в известном способе - 5,6%, т.е. выход полисахаридного комплекса в заявляемом способе в 2,25 раза выше, чем в известном.

Кроме того, заявляемый способ обеспечивает высокие выходы и других веществ: маннит 7,85%, ламинаран 4,53%, фукоидан 2,14%, альгинат натрия 12,41%.

3. Расширение сырьевой базы. Впервые в качестве источника сырья используется естественная смесь двух видов ламинарий (*Laminaria saccharina* и *Lam. digitata* L.), образующих заросли в бассейне Белого моря. Кроме того, заявляемый способ позволит применительно к условиям Архангельского опытного водорослевого комбината переработать беломорскую ламинарию, имеющую ежегодные многотоннажные сырьевые запасы.

4. Повышение биологической активности. Водорастворимый полисахаридный комплекс типа "Ламинарид", полученный по заявляемому способу оказывает слабительное действие, превосходящее такое действие эталонного официального препарата "Ламинарид" на 5,2-60,0% (в зависимости от методики опыта и вида животных).

5. Расширение спектра биологического действия. Впервые установлено:

а) Слабительное действие маннита, которое превышает действие "Ламиарида" 41,1%;

слабительное действие ламинарана и фукоидана, превосходящее действие официального слабительного препарата "Ламинарид" - на 20,5%;

слабительное действие альгината натрия, превосходящее действие "Ламиарида" - на 141,1%;

б) радионуклидсвязывающее действие альгината натрия, которое превосходит такое действие эталона - цитрусового пектина - на 45,36%;

радионуклидсвязывающее действие водорастворимого полисахаридного комплекса, которое превосходит аналогичное действие эталона - цитрусового пектина - на 280,78%;

в) гипохолестеринемическое действие альгината натрия, который вызывает значительное снижение общего холестерина в крови, по-существу обеспечивая нормализацию его содержания у животных с гиперхолестеринемией;

гиполипидемическое действие водорастворимого полисахаридного комплекса, который наиболее заметно понижает уровень триглицеридов в крови, слабее - снижает уровень холестерина в крови. Причем гипохолестеринемическая и противоатеросклеротическая активности водорастворимого полисахаридного комплекса были выше аналогичного действия препарата "Ламинарид" и официального

противоатеросклеротического препарата полиспонин;

г) гепатозащитное действие водорастворимого полисахаридного комплекса, превышающее аналогичное действие "Ламиарида" и приближающееся по своей выраженности к действию официального гепатозащитного протектора силибора;

д) противоязвенное действие водорастворимого полисахаридного комплекса.

При наличии широкого спектра биологического действия исследуемые целевые продукты оказались практически нетоксичными, что позволило их рекомендовать как эффективные полифункциональные средства. При этом особенно благоприятным является сочетание слабительного и радионуклидсвязывающего действия, которое способствует быстрому связыванию и выведению радионуклидов.

Формула изобретения:

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛАМИНАРИИ путем экстракции измельченного сырья, отделения экстракта, его упаривания и выделения целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью интенсификации процесса переработки сырья и одновременного получения нескольких биологически активных веществ и повышения выхода водорастворимого полисахаридного комплекса, используют смесь слоевищ *Laminaria saccharina* и *L. digitata*, измельченную смесь экстрагируют 90 - 96%-ным этанолом в соотношении сырье : этанол 1 : 6 в течение 3 ч, этанольное извлечение концентрируют и выкристаллизовывают маннит, обладающий слабительным действием, сырье после извлечения маннита обрабатывают горячей водой в соотношении 1 : 10 в течение 30 мин двукратно и водорастворимый полисахаридный комплекс, обладающий слабительным, противоязвенным и радионуклидсвязывающим действием, осаждают двукратным объемом этанола, спиртовой маточный раствор упаривают после осаждения полисахаридного комплекса, обрабатывают трехкратным объемом 80%-ного этанола, осадок отделяют центрифугированием, обрабатывают пятикратным объемом 0,4%-ного раствора соляной кислоты в течение 2 ч и осаждают 0,5 М раствором цетавлона, образовавшийся осадок растворяют в соляной кислоте и фукоидан, обладающий слабительным действием, осаждают трехкратным объемом 70%-ного этанола, ламинаран, обладающий слабительным действием, получают из надосадочной жидкости после осаждения фукоидана обработкой ее трехкратным объемом 80%-ного спирта, альгинат натрия, обладающий слабительным и радионуклидсвязывающим действием, получают путем обработки оставшегося жома слоевищ 1,5%-ным раствором карбоната натрия в соотношении 1 : 20 при 50 °С в течение 1 ч, далее отделения экстракта и осаждения альгиновой кислоты обработкой экстракта серной кислотой, переводом ее в альгинат натрия, обработкой осадка раствором карбоната натрия и осаждением целевого продукта этанолом.

Таблица 1

Результаты хроматографического анализа маннита

Метод	Подвижная фаза	Проявитель	Кол-во и R_f пятна	Примечание
Бумажная хроматография (нисходящий способ)	Пропанол-этил-ацетат-вода (7:1:2)	Анилинтрихлор-ацетат	1 пятно с $R_f=0,34$ Свидетель имеет 1 пятно с $R_f=0,34$	В качестве свидетеля использовали 1%-ный раствор маннита

RU 2028153 C1

RU 2028153 C1

Таблица 2

Результаты анализа физико-химических показателей маннита

Показатель	Показатель	
	маннит, полученный заявляемым способом	стандартный маннит (реактив) квалификация ч.д.з.
Температура плавления, °С	166	166-169
Удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$ 10%-ного раствора маннита в растворе натрия тетрабората	+ 23	(+23)–(+24)
Зольность, %	0,05	0,10

Таблица 3

Результаты качественного анализа водорастворимого полисахаридного комплекса с помощью цветных реакций

Реактив	Результаты реакций
α -Нафтолсерная кислота (на углеводную группу)	Реакция положительная (красно-фиолетовое окрашивание)
Раствор нафторезорцина в среде концентрированной серной кислоты (на уроневые кислоты)	Реакция положительная (фиолетовое окрашивание)
Раствор карбазола в среде концентрированной серной кислоты (на нейтральные и кислые полисахариды)	Реакция положительная (грязно-фиолетовое окрашивание)

Таблица 4

Результаты хроматографического анализа водорастворимого полисахаридного комплекса после кислотного гидролиза (10% серная кислота, 100°C, 2 ч)

Метод	Подвижная фаза	Проявитель	Кол-во и R_f пятен	Примечание
Бумажная хроматография (нисходящий способ)	н-Бутанол-уксус- ная кислота-во- да (4:1:5)	Кислый ани- линфталат	4 пятна с $R_f=0,16$; 0,18;0,20;0,21 Свидетели: 4 пятна с $R_f=0,16$; 0,18;0,20;0,22	В качестве сви- детелей исполь- зовали 1%-ный растворы глюко- зы, галактозы, маннозы, араби- нозы

Таблица 5

Результаты анализа физико-химических показателей ламинарана

Наименование показателей	Показатель	
	полученные	литературные
Удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$ водного раствора ламинарана	- 12°	- 12°
Зольность, %	1,5	1,5-3,0

Таблица 6

Результаты хроматографического анализа ламинарана

Метод	Подвижная фаза	Проявитель	Кол-во и R_f пятен	Примечание
Бумажная хроматография (нисходящий способ)	н-Бутанол-пиридин-вода (6:4:3)	Кислый анилинфталат	1 пятно с $R_f=0,16$ Свидетель: 1 пятно с $R_f=0,16$	В качестве свидетеля использовали 1%-ный раствор глюкозы

Таблица 7

Результаты хроматографического анализа фукоидана

Метод	Подвижная фаза	Проявитель	Кол-во и R_f пятен	Примечание
Бумажная хроматография (нисходящий способ)	н-Бутанол-пиридин-вода (6:4:3)	Кислый анилинфталат	1 пятно с $R_f=0,15$ Свидетель: 1 пятно с $R_f=0,15$	В качестве свидетеля использовали 1%-ный раствор фукозы

Таблица 8

Результаты качественного анализа фукоидана с помощью цветных реакций

Наименование реактива	Результаты реакций
Ацетон и концентрированная соляная кислота (на 6- дезоксигексозы)	Реакция положительная (малиновое окрашивание, максимум поглощения при 550 нм)
L-цистеин и концентрированная серная кислота (на 6- дезоксигексозы)	Реакция положительная (желтое окрашивание, максимумы поглощения при 400 и 427 нм)
Тиогликолевая и серная кислота (на 6- дезоксигексозы)	Реакция положительная (желто-зеленое окрашивание)

Таблица 9

Результаты качественного анализа альгината натрия с помощью цветных реакций

Наименование реактива	Результаты реакций
Орцин и хлорное железо (на уроновые кислоты)	Реакция положительная (коричневое окрашивание)
Реакция окрашивания пламени горелки (на ионы натрия)	Реакция положительная (ярко-желтое окрашивание)

Таблица 10

Зависимость выхода маннита от концентрации этанола

Концентрация этанола, %	80	85	90	96
Выход маннита, %	6,94	7,13	7,85	7,85

Таблица 11

Влияние соотношения сырье:этанол на выход маннита

Соотношение сырье : этанол	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
Выход маннита, %	6,42	6,83	7,21	7,85	7,80

Таблица 12

Зависимость выхода маннита от продолжительности экстракции

Продолжительность экстракции, час	1	2	3	4
Выход маннита, %	6,22	7,12	7,85	7,79

Таблица 13

Влияние температуры воды на выход водорастворимого полисахаридного комплекса

Температура, °С	50	60	70	80	90
Выход водорастворимого полисахаридного комплекса, %	10,15	11,96	12,43	12,60	12,51

Таблица 14

Зависимость выхода водорастворимого полисахаридного комплекса от соотношения сырье:вода

Соотношение сырье : вода	1:5	1:10	1:15
Выход водорастворимого полисахаридного комплекса, %	11,77	12,60	12,53

Таблица 15

Зависимость выхода водорастворимого полисахаридного комплекса от продолжительности экстракции

Продолжительность экстракции, мин	15	30	45	60
Выход водорастворимого полисахаридного комплекса, %	11,38	12,60	12,48	12,40

Таблица 16

Влияние соотношения экстракт:этанол при осаждении водорастворимого полисахаридного комплекса

Соотношение экстракт : этанол	1:1	1:2	1:3
Выход водорастворимого полисахаридного комплекса, %	11,78	12,60	12,57

Таблица 17

Влияние концентрации этанола на выход суммы ламинарана и фукоидана

Концентрация этанола, %	70	80	90	96
Выход суммы ламинарана и фукоидана, %	6,88	7,45	7,42	7,42

Таблица 18

Влияние соотношения экстракт:этанол при осаждении суммы ламинарана и фукоидана на их выход

Соотношение экстракт : этанол	1:1	1:2	1:3	1:4
Выход суммы ламинарана и фукоидана, %	5,83	6,52	7,45	7,40

Таблица 19

Влияние концентрации соляной кислоты на растворимость ламинарана и фукоидана при комнатной температуре

Концентрация соляной кислоты, %	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Растворимость ламинарана и фукоидана, г веществ на 100 мл кислоты	0,95	1,02	1,13	1,21	1,20

RU 2028153 C1

RU 2028153 C1

Таблица 20

Влияние соотношения осадок ламинарана и фукоидана:раствор соляной кислоты на растворимость осадка

Соотношение осадок ламинарана и фукоидана : раствор соляной кислоты	1:3	1:4	1:5	1:6
Растворимость осадка, г осадка в 100 мл 0,4% раствора кислоты	1,01	1,15	1,21	1,20

Таблица 21

Влияние продолжительности обработки осадка ламинарана и фукоидана раствором соляной кислоты на растворимость осадка

Продолжительность обработки осадка ламинарана и фукоидана раствором соляной к-ты, час	1,0	1,5	2,0	2,5
Растворимость осадка, г осадка в 100 мл 0,4% -ного раствора кислоты	0,93	1,10	1,21	1,20

Таблица 22

Влияние концентрации этанола при осаждении ламинарана на его выход

Концентрация этанола, %	70	80	90	96
Выход ламинарана, %	4,11	4,53	4,50	4,50

Таблица 23

Влияние соотношения экстракт:этанол на выход ламинарана при его осаждении

Соотношение экстракт:этанол	1:1	1:2	1:3	1:4
Выход ламинарана, %	3,92	4,12	4,53	4,48

Таблица 24

Влияние концентрации этанола на выход фукоидана при его осаждении

Концентрация этанола, %	50	60	70	80
Выход фукоидана, %	1,43	1,95	2,14	2,10

Таблица 25

Зависимость выхода фукоидана от соотношения солянокислый раствор:этанол при осаждении фукоидана

Соотношение солянокислый раствор:этанол	1:1	1:2	1:3	1:4
Выход фукоидана, %	1,95	2,03	2,14	2,12

Таблица 26

Зависимость выхода альгината натрия от концентрации карбоната натрия

Концентрация карбоната на- трия, %	0,5	1,0	1,5	2,0
Выход альгината натрия, %	10,10	11,33	12,41	12,35

Таблица 27

Зависимость выхода альгината натрия от соотношения сырье:раствор карбоната натрия

Соотношение сырье:раствор карбоната натрия	1:10	1:15	1:20	1:25
Выход альгината натрия, %	10,37	11,82	12,41	12,35

Таблица 28

Влияние температуры экстракции сырья на выход альгината натрия

Температура экстракции, °С	40	50	60	70
Выход альгината натрия, %	12,01	12,41	12,35	12,33

Таблица 29

Влияние продолжительности экстракции сырья на выход альгината натрия

Продолжительность экстра- кции, час	0,5	1,0	1,5
Выход альгината натрия, %	11,75	12,41	12,35

Таблица 30

Влияние концентрации этанола на выход альгината натрия при его осаждении

Концентрация этанола, %	70	80	90	96
Выход альгината натрия, %	10,73	11,56	12,13	12,41

RU 2028153 C1

RU 2028153 C1

Таблица 31

Влияние соотношения щелочной раствор: этанол на выход альгината натрия при его осаждении

Соотношение щелочной раствор: этанол	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Выход альгината натрия, %	6,94	9,35	11,47	12,05	12,41	12,38

Таблица 32

Результаты испытаний радионуклидсвязывающей активности альгината натрия

Образцы	Сорбция		Десорбция		РНСА	
	N, с ⁻¹	П _с	N, с ⁻¹	П _д	в относительных величинах	в %
Альгинат натрия	4,84	26,90	0,40	4,00	6,73	145,36
Пектин цитрусовый	1,25	6,94	0,15	1,50	4,63	100,00

Примечание: П_с – показатель сорбции,
П_д – показатель десорбции (относительные величины)

Таблица 33

Гепатозащитное действие водорастворимого комплекса из беломорских водорослей

Условия опыта, n	АлТ крови (МКат/е), M±m, P, % изм. к контролю	ЩФ крови (Е/л) M±m, P, % изм. к контролю	Триглицериды крови (ммоль/л), M±m, P, % изм. к контролю	Общий билирубин крови (МК моль/л), M±m, P, % изм. к контролю	Триглицериды печени (мг/г сырой ткани) M±m, P, % изм. к контролю
Интактные животные n=7	0,31±0,03	45,3±5,5	0,94±0,09	15,75±4,96	12,4±0,69
Животные с дистрофией печени (контроль) n=7	0,59±0,05	67,4±3,7	2,33±0,20	24,65±4,11	26,6±2,7
Животные с дистрофией печени, получавшие силибор n=8	0,34±0,04 P<0,001 - 42,3%	46,3±1,4 P<0,001 - 31,5%	0,74±0,06 P<0,001 - 68,4%	17,98±0,51 P>0,5 - 27,0%	13,2±0,37 P<0,001 - 49,8%

Условия опыта, n	АлТ кро- ви (MKat/e), M±m ,P,% изм. к конт- ролю	ЩФ крови (Е/л) M±m ,P,% изм. к контролю	Триглицери- ды крови (ммоль/л), M±m ,P,% изм. к контролю	Общий би- лирубин крови (МК моль/л), M±m ,P,% изм. к контролю	Триглицериды печени (мг/г сырой ткани) M±m ,P,% изм. к контролю
Животные с дистрофией печени, по- лучавшие ламинарид n=12	0,37±0,02 P<0,001 - 35,7%	47,0±1,5 P<0,001 -14,3%	1,27±0,17 P<0,001 - 45,5%	13,52±1,37 P<0,05 - 45,0%	16,8±2,2 P<0,01 -36,7%
Животные с дистрофией печени, по- лучавшие водораствори- мый комп- лекс из беломорских водорослей n=12	0,38±0,03 P<0,001 - 35,6%	50,5±2,4 P<0,001 -25,1%	0,93±0,12 P<0,001 - 59,5%	14,55±3,25 P>0,05 - 41,0%	14,9±1,3 P<0,001 - 43,6%

Т а б л и ц а 34

Гиполипидемическое действие водорастворимого полисахаридного комплекса

Условия опыта	Триглицериды крови (ммоль/л), M ± m , n,P,% изм.к контролю	Холестерин кро- ви (ммоль/л) M ± m , n,P,% изм.к контролю	Холестерин аор- ты (г/кг) M ± m , n,P,% изм.к контролю
Интактные жи- вотные	0,96±0,09 n=4	1,79±0,11 n=10	1,58±0,12 n=8
Животные с ги- перлипидемией	2,22±0,14 n=17	2,90±0,13 n=12	2,28±0,15 n=10
Животные с ги- перлипидемией, получавшие ла- минарид	1,51±0,14 n=12 P<0,001 - 32,3%	2,23±0,06 n=12 P<0,02 - 24,6%	2,22±0,22 n=6 P>0,5 - 2,7%

Условия опыта	Триглицериды крови (ммоль/л), M ± m, n, P, % изм.к контролю	Холестерин кро- ви (ммоль/л) M ± m, n, P, % изм.к контролю	Холестерин аор- ты (г/кг) M ± m, n, P, % изм.к контролю
Животные с ги- перлипидемией, получавшие во- дорастворимый полисахаридный комплекс	1,24±0,13 n=12 P<0,001 - 44,6%	2,28±0,09 n=12 P<0,02 - 22,9%	2,79±0,32 n=4 P>0,5 + 22,3%
Животные с ги- перлипидемией	-	5,0±0,1 n=9	-
Животные с ги- перлипидемией, получавшие по- лиспонин (10 мг/кг)	-	4,1±0,1 n=9 P<0,001 - 18,0%	-

Таблица 35

Влияние водорастворимого комплекса на слизистую оболочку желудка

Группы животных	Кол-во животных	Кол-во язв в желудке			Кол-во эрозий в желудке		
		M ± m	P	%	M ± m	P	%
Контроль- ные жи- вотные	10	4,9±0,37	-	100,0	8,1±0,64	-	100,0
Живо- тные, получав- шие водо- раствори- мый ком- плекс	10	3,5±0,30	< 0,01	71,4	6,5±0,50	<0,05	80,2
Животные, получав- шие пре- парат ламина- рид	10	3,6±0,30	<0,01	73,4	6,4±0,57	< 0,05	79,0

Таблица 36

Результаты испытаний радионуклидсвязывающей активности водорастворимого комплекса
(ВК) типа "Ламинарид"

Образцы	Сорбция		Десорбция		РНСА	
	N, c^{-1}	P_c	N, c^{-1}	P_d	в отно- сит. вел.	%
ВК типа "Ламинарид"	3,49	19,39	0,11	1,10	17,63	380,78
Пектин цитру- совый	1,25	6,94	0,15	1,50	4,63	100,00

П р и м е ч а н и е. P_c – показатель сорбции;
 P_d – показатель десорбции (относительные величины)

RU 2028153 C1

RU 2028153 C1